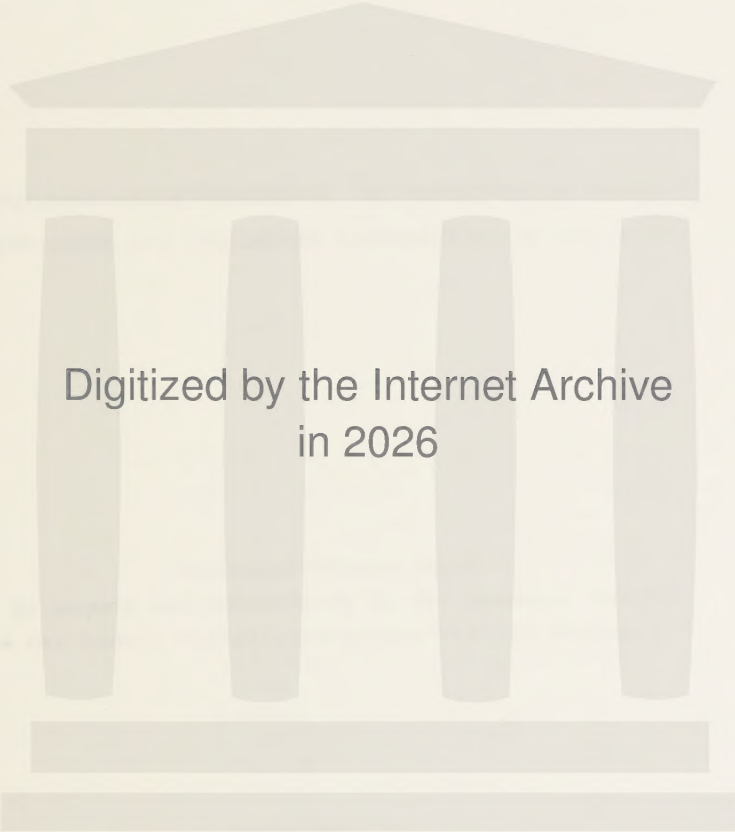


**ULTRAMIKROELEKTROPHORESEN VON PROTEINEN
IM SCHWEISS VON PATIENTEN MIT
CYSTISCHER PANCREASFIBROSE UND KONTROLLEN**

Claus-P. Schröder

1980



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0054

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Direktor: Professor Dr. K. Betke

ULTRAMIKROELEKTROPHORESEN VON PROTEINEN IM SCHWEISS
VON PATIENTEN MIT CYSTISCHER PANCREASFIBROSE UND KONTROLLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Claus-P. Schröder
aus
Weisingen

Jahr
1979

Berichterstatter: Prof. Dr. H. M. Emrich

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 1980



Meiner Frau

INHALT

	Seite
1. EINLEITUNG	1
Hypothesen zur Pathogenese der Cystischen Pancreasfibrose und des "C.F.-Faktors"	
1.1. Ziel der Arbeit	3
2. METHODEN	5
2.1. Einführung in die Diskelektrophorese	6
2.2. Herstellung der verwendeten Gele und Puffer	8
3. ERGEBNISSE	13
4. DISKUSSION	17
5. ZUSAMMENFASSUNG	21
6. ABBILDUNGEN	22
7. QUELLEN	28

1. EINLEITUNG

Hypothesen zur Pathogenese der Cystischen Pancreasfibrose und des "C.F.-Faktors"

Der Begriff "Cystische Pancreasfibrose" (C.F.) wurde erstmals 1936 von FANCONI (18) verwendet. Den gleichen Symptomenkomplex benannte FARBER (19) 1945 "Mukoviscidose", um den Anstieg der Viskosität der Sekrete muköser Zellen zu beschreiben. Die klassischen Symptome dieser autosomal-rezessiv vererbten Krankheit sind (37, 45): chronische Bronchitis, Pancreasinsuffizienz mit Steatorrhoe, Untergewicht, Minderwuchs, häufig biliäre Zirrhose (2) und die von DI SANT'AGNESE (1) 1953 gefundene Na- und Cl-Konzentrationserhöhung im Schweiß (ebenso 15, 16).

Zur Aufklärung der Ursache der Sekretstörung wurden physiologische und biochemische Arbeiten durchgeführt (Übersicht: LOBECK, C. C. (37)). Von MANGOS und McSHERRY, die C.F.-Schweiß (39) bzw. C.F.-Speichel (40) retrograd in die Parotis einer Ratte infundierten, wurde eine dadurch induzierte Erhöhung der Na- und K-Konzentration im Parotissekret gefunden. Dies wies auf die Existenz eines übertragbaren, pathogenen, humoralen "Faktors" hin. Die durch die Wirkung dieser hypothetischen, abnormen Substanz ausgelöste Ionenkonzentrationserhöhung kann grundsätzlich entweder durch eine verstärkte passive Ionendiffusion in das Drüsenlumen aufgrund einer größeren Permeabilität des Drüsenepithels oder durch eine Hemmung des aktiven Na-Rückresorptionsmechanismus aus dem Drüsenlumen bedingt sein. KAISER et al. (34), die die Versuche von MANGOS und McSHERRY modifizierten und C.F.-Schweiß retrograd in den Gang gesunder menschlicher Schweißdrüsen infundierten, fanden ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Na- und K-Konzentration im Sekret der so behandelten Drüsen im Vergleich zur Infusion mit Normalschweiß.

MANGOS et al. (42) fanden die Rückresorption von Na in der Rattenparotis nach Perfusion der Ausführungsgänge entweder mit C.F.-Speichel oder mit Oubain in ähnlicher Höhe gehemmt, was sie zu der Überlegung einer gemeinsamen Art der Hemmung führte. Sie postulierten eine Hemmung des aktiven Na-Transports der Epithel-

zellen des Ausführungsganges, die den Netto-Wasser-Transport weitgehend unbeeinflusst läßt. Das Prinzip, das der Störung der exokrinen Drüsen zugrunde liegt, wird übereinstimmend von MANGOS (39), BARNETT (5), BOWMAN (9), HERZBERG (31), WILSON (59) und TAYLER (57) mit der Anwesenheit eines "C.F.-Faktors" erklärt, der die aktive transepitheliale NaCl-Rückresorption in den Ausführungsgängen von Schweißdrüsen hemmt (39, 40, 41, 5, 9, 31, 42, 59, 57). Dieser Na-Transporthemmungsfaktor wurde von MANGOS et al. (39, 40) und anderen Untersuchern (57, 41, 42) sowohl im Schweiß als auch im Speichel von C.F.-Patienten nachgewiesen; von weiteren Untersuchern (56, 12, 30) auch im Serum von C.F.-Patienten.

Neben der Hemmung der Na- und Cl-Rückresorption wurde dem Faktor die Fähigkeit zugeschrieben, die Motilität von Cilien zu hemmen (32, 3, 30, 9). Diese Eigenschaft wurde an Cilien von Kaninchentrachea (56), bei Austern (8), bei Süßwassermuscheln (7) und Geißeln von Protozoen (22) nachgewiesen. SPOCK (56) und andere Untersucher fanden diesen Cilienhemmfaktor im Serum (21, 12, 13, 59, 9, 10, 4, 30, 61), im Speichel (41, 21, 9, 10, 12) und in der Amnionflüssigkeit (9) von C.F.-Patienten.

Übereinstimmend wurde dem Faktor eine basische (polykationische) Struktur zugeschrieben, da er mit dem sauren Polyanion Heparin präzipitierte (53, 41, 21, 5, 10, 13, 12, 35, 59, 6).

Da Amylase aus der Parotis von C.F.-Patienten eine Cilienhemmung bewirkte und nach der Entfernung der Amylase durch Heparin keine Cilienhemmung mehr auftrat, wurde vermutet, daß der C.F.-Faktor und Amylase identisch seien (12). DOGGETT et al. (13) fanden in vivo an C.F.-Patienten unter Heparinisierung eine Senkung der Amylaseaktivität, jedoch ohne daß die NaCl-Konzentration im Schweiß vor, während oder nach Heparininjektionen signifikant unterschiedlich waren. Es konnten weder eine abnorme Amylase gefunden werden (12), noch fanden NIKOLAJEK und EMRICH (49) einen signifikanten Unterschied der Amylasekonzentration im Serum oder Schweiß von C.F.-Patienten gegenüber Kontrollen. Es ist zu vermuten, daß die katione Struktur der Amylase eine dem C.F.-Faktor ähnliche Wirkung ausüben kann.

NELSON (22) behauptete, daß Polyamine und ihre Oxydationen einen ciliostatischen Effekt haben und so eine Bindung der Polyamine an Amylase diese in einen Cilienhemmfaktor umwandeln. McEVOY (46) fand später keinen Unterschied der Polyamine bei Gesunden und C.F.-Kranken und schloß damit aus, daß der C.F.-Faktor ein Polyamin sei.

RAO und NADLER (52) fanden einen quantitativen und qualitativen Unterschied der Argininesteraseaktivität im Plasma von C.F.-Patienten und Kontrollen und machten das Fehlen eines speziellen Argininesterase-isoenzym bei C.F.-Patienten für das Auftreten eines C.F.-Faktors verantwortlich.

LOUISOT (38) vermutete eine Hyperaktivität der Glycosyltransferase als Ursache der C.F.-Erkrankung.

GIBBS und GRIFFIN (23, 24) berichteten von einer 20% erniedrigten Beta-Glucuronidaseaktivität der Schweißdrüsen bei C.F.-Kranken im Vergleich zu Gesunden, während EVANS (17) später keinen signifikanten Unterschied in der Beta-Glucuronidaseaktivität im Schweiß Gesunder zu C.F.-Kranken fand.

Beim Versuch, den C.F.-Faktor näher zu identifizieren, konnte der C.F.-Faktor von mehreren Untersuchern (21, 4, 9, 31, 61) der Gamma-Globulinfraktion und hier der IgG-Fraktion zugeordnet werden. Dabei wurde allerdings gefunden, daß der C.F.-Faktor nicht auf einer AG-AK-Reaktion beruht (9, 31) und auch keinen Autoantikörper darstellt (31). Er wurde sowohl bei C.F.-Patienten als auch bei Heterozygoten gefunden (9). Dabei war der IgG-Spiegel von Homozygoten um 200%, der von Heterozygoten um 30% höher als der von Kontrollen (BOWMAN (21)). Durch die Möglichkeit der proteolytischen Verdauung mit Pepsin oder Papain wurde die Proteinnatur des Faktors bewiesen (9) und von WILSON (59) bestätigt.

1.1. Ziel der Arbeit

Von allen betroffenen exocrinen Drüsen zeigen bei C.F.-Kranken die Schweißdrüsen den deutlichsten Defekt des Na-Transports. Da sowohl die Anwesenheit des C.F.-Faktors im Schweiß (s.o.) als

auch seine Proteinnatur (s.o.) von den meisten Untersuchern angenommen wird, mußte man vermuten, daß der C.F.-Faktor mit proteinchemischen Methoden im Schweiß von C.F.-Patienten nachweisbar sein oder zumindest ein Unterschied der Proteine im C.F.-Schweiß zu Kontrollen dazustellen sein sollte. Dieses Vorgehen erschien vielversprechender als der Nachweis im Serum oder Speichel, da in diesen Körperflüssigkeiten bereits große Mengen anderer Proteine vorhanden sind. Schon in früheren Untersuchungen wurde zwar Protein im Schweiß nachgewiesen (33, 51) dabei implizierte jedoch die Technik der Schweißabnahme (Filterpapiermethode) bereits die Möglichkeit der Verfälschung der Werte durch Verunreinigung mit Protein aus abgeschilferten Epithelzellen der Haut. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode verwendet, mit deren Hilfe es möglich war, den Schweiß weitgehend rein zu gewinnen und durch Ultramikroelektrophorese noch geringste Mengen Protein zu trennen und nachzuweisen.

2. METHODEN

C.F.- und Kontroll-Patienten entstammten der gleichen Altersgruppe und hatten ein Durchschnittsalter von 8 Jahren. Die Schweißbildung wurde durch Pilocarpin-Iontophorese angeregt (25). Die Schweißsammlung erfolgte von der Streckseite der Finger, die unter Paraffinöl fixiert waren (Methode von EMRICH und ULLRICH (15)). Dabei wurden einzelne Schweißtropfen unter dem Stereomikroskop mit Mikroglaskapillaren aufgesaugt. Für jedes Experiment wurden Proben von ca. 5-20 μ l verwandt. Die Schweißflußrate variierte zwischen 200 und 400 μ l/Drüse/h. Der Schweiß wurde ca. 450fach auf 5×10^{-8} l (im Mittel), meist durch Zugabe von "Sephadex G-10", konzentriert.

Die Sephadexperlen bestehen aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Polysaccharidketten. Sie verhalten sich indifferent gegenüber Kationen und Anionen und sind stark hydrophil (54). Wasser und niedermolekulare Stoffe werden durch die quellenden Sephadexperlen absorbiert, während die hochmolekularen Stoffe im äußeren Medium verbleiben. Änderungen der Ionenstärke oder des pH-Wertes beeinflussen die Molekülsiebeigenschaften von Sephadex nicht (55). Die Sephadexperlen haben eine Ausschlußgrenze oberhalb welcher Moleküle nicht mehr in die Gelkörner eindringen können; beim Typ G-10 ist diese Ausschlußgrenze ein MG von mehr als 700.

Der konzentrierte Schweiß wurde in Microcaps, die mit Polyacrylamid-Gel gefüllt waren, bei pH 2,3 und pH 8,9 analysiert. Die Microcaps wurden mit Mikromanipulatoren unter mikroskopischer Kontrolle gefüllt. Nachdem die Kapillaren in eine Elektrophoresekammer gebracht waren, wurde eine konstante Spannung angelegt (Einzelheiten siehe: GROSSBACH, 1975 (28)). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine in 20% Trichloressigsäure fixiert und mit 0,1% Coomassie-brillant-blue gefärbt (29, 47). Dabei können mit dieser Technik Proteinkonzentrationen bis zu 10^{-9} g/Proteinbande dargestellt werden.

2.1. Einführung in die Diskelektrophorese

Bei der Elektrophorese findet eine Auftrennung verschiedener, elektrisch geladener Teilchen statt, die sich in einem Träger aufgrund einer angelegten Spannung und eines Stromflusses bewegen. Die Trennung ist abhängig von Größe, Gestalt, Konzentration, elektrischer Ladung, Hydratation und Dissoziationsgrad des Teilchens, Viskosität, Porengröße, pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Mediums und der elektrischen Feldstärke, Elektrophoresezeit und Länge des Trennwegs.

Wir verwendeten Polyacrylamid-Gel als Träger, das durch Polymerisation von Acrylsäureamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) und dem Vernetzer N,N'-Methylenbisacrylsäureamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) entsteht und ein dreidimensionales Gitterwerk bildet. Viskosität, Elastizität und Festigkeit des Gels, ebenso wie Porengröße des Gitterwerks hängen von der Kettenlänge des Polyacrylamids und der Menge des eingebauten Vernetzers ab (50). Zur Kopolymerisation der Polyacrylamid-Gele wurden Katalysator-Redoxsysteme verwendet, die freie Radikale liefern: Ammoniumperoxodisulfat - N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin und als Photokatalysatorsystem: Riboflavin - N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin.

Durch die Poren entsteht ein Molekularsiebeffekt. Die Diffusion der Proteine ist gering - verglichen mit der Schnelligkeit, die durch die Elektrophorese hervorgerufen wird - reduziert man durch hohe Acrylamid-Gel-Konzentration die Porengröße des Gels gegen den Teilchendurchmesser (28). Ebenso kann die Diffusion auch durch Zugabe von z.B. Saccharose zum Trenngel erniedrigt und die Trennschärfe der Banden dadurch erhöht werden (14). Die Moleküle werden nicht nur nach Ladung, abhängig von der Stromrichtung, sondern auch nach Größe und Form getrennt.

Benutzt man Polyacrylamid-Gel-Säulen von nur wenigen Millimetern Durchmesser, kann man Proteinbanden anfärben, die Protein in der Größenordnung von Mikrogramm enthalten (28). Da diese Empfindlichkeit für unsere Versuche jedoch noch nicht ausreichte, haben wir Säulen von 10-20fach verringertem Durchmesser benutzt, mit denen sich Protein in der Größenordnung von 10^{-8} - 10^{-9} g dar-

stellen läßt (27).

Die Schnelligkeit der Teilchen im elektrischen Feld ist direkt von der Feldstärke abhängig. Bei hoher Feldstärke kann man die Elektrophorese-Zeit kurz halten, jedoch entsteht eine große Widerstandswärme, die wiederum die Diffusion erhöht. Bei den kleinen Gel-Säulen entsteht diese Wärme durch das günstige Oberflächen-Volumen-Verhältnis weit weniger, sodaß mit hohen Spannungsgradienten von 40 - 100 Volt/cm gearbeitet werden kann (28). Gleichzeitig können höher konzentrierte Trenngele benutzt werden, deren elastisches Netzwerk sogar Porengrößen mit einem geringeren Durchmesser als die Moleküle zulassen (44, 26). Ein weiterer Vorteil der kleinen Gel-Säulen ist, daß die Fixierung der Proteine nach der Elektrophorese in einem Bruchteil der Zeit erfolgt, die für die üblichen 5mm-Durchmesser-Gele gebraucht wird und die Banden sich somit nicht mehr durch Diffusion verändern können.

In den diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen werden Paare unterschiedlicher pH-Werte und Zusammensetzung sowie Gelteile unterschiedlicher Porengröße verwendet (50, 11). Kombinationen von Elektroden-, Proben-, Sammelgel- und Trenngel-Puffer werden für die verschiedenen pH-Bereiche beschrieben (43).

In einem großporigen Sammelgel entsteht eine hoch konzentrierte, sehr schmale Protein-Zone. Dies gelingt durch Verwendung von Leit- und Folge-Ionen (43), die - nach dem Regulationseffekt nach Kohlrausch (36) - durch Wechselwirkung zwischen Beweglichkeit und Feldstärke, bewirkt durch einen entsprechenden pH-Wert und einen elektrischen Stromfluß, die zwischen ihnen wandernden Proteine zu einer scharfen Bande zusammenzupressen. An der Grenze zwischen Sammelgel und kleinporigem Trenngel findet ein Wechsel in der Porengröße und im pH-Wert statt. Der pH-Wert des Trenngels bewirkt eine erhöhte Dissoziation der Folgeionen, damit wird deren Beweglichkeit erhöht, sie überholen die Proteine und bedingen einen Feldstärkewechsel. Danach bewegen sich die Proteine in einem Gebiet, in dem Feldstärke und pH-Wert einheitlich sind (43).

Damit wird innerhalb des großporigen Polyacrylamid-Sammelgels eine hoch konzentrierte, schmale Startzone erreicht und in dem anschließenden Trenngel eine Auftrennung nach Molekül-Größe, -Ge-

stalt und -Ladung. WHITE (58) fand, daß keine spezifische Wechselwirkung zwischen Elektrolyt oder Nichtelektrolyt und Gel auftreten.

Während Diskelektrophoresen im allgemeinen bei konstantem Stromfluß durchgeführt werden, da konstante Spannung den Widerstand erhöht, die Geschwindigkeit der wandernden Moleküle herabgesetzt und so durch Diffusion die Zonen verbreitert werden, kann bei der Mikro-Elektrophorese wegen der kurzen Elektrophorese-Zeit eine konstante Spannung benutzt werden, die zumal besser zu halten ist, als Strom im Mikroampere-Bereich (28).

2.2. Herstellung der verwendeten Gele und Puffer

Für die Elektrophoresen bei pH 2,3 wurde das Standard-Gel nach MOSS-INGRAM (48) hergestellt. Der pH-Wert 2,3 - nach dem die Elektrophorese bezeichnet wird - ist der pH-Wert des Trenngels. Das Sammelgel hat einen dazu passenden pH-Wert von 5,9, der Elektrodenspuffer von 4,0.

Zur Vereinfachung der Herstellung der verschiedenen Gele wurden "Stammlösungen" hergestellt:

Stammlösung A: 12,00 ml 1 N KOH
53,25 ml Eisessig
1,15 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylen-
diamin mit Aqua dest auf 100 ml

Stammlösung B: 48,00 ml 1 N KOH
2,95 ml Eisessig
mit Aqua dest auf 100 ml

Stammlösung D: 10,0 g Acrylamid
2,5 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid
mit Aqua dest auf 100 ml

Stammlösung E: 4 mg Riboflavin
mit Aqua dest auf 100 ml

Katalysatorlösung: 1,4 g Ammoniumperoxodisulfat
in 50 ml Aqua dest

Läuft eine Probe z.B. in 7%igem Gel, so sind im Trenngel 7 Gewichtsprocente Acrylamid vorhanden (43).

Für das 7%ige Trenngel wurden verwendet:

2 Teile Stammlösung A
mit 1 Teil von: 28,0 g Acrylamid
0,735 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid
mit Aqua dest auf 100 ml
und 1 Teil Katalysatorlösung.

Für das 15%ige Gel wurden gemischt:

2 Teile Stammlösung A
mit 1 Teil von: 60,000 g Acrylamid
0,735 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid
mit Aqua dest auf 100 ml
und 1 Teil Katalysatorlösung.

Da man für das 20%ige Gel nach obigem Schema 80,0 g Acrylamid in 100 ml Aqua dest lösen müßte, was physikalisch nicht möglich ist, haben wir hier zu anderen Mischungsverhältnissen gegriffen:

1,5 Teile Stammlösung A
mit 1,0 Teile von: 60,000 g Acrylamid
0,735 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid
mit Aqua dest auf 100 ml
und 0,5 Teile der Katalysatorlösung:
2,1 g Ammoniumperoxodisulfat
in 50 ml Aqua dest

Das Sammelgel war für alle Elektrophoresen, die bei pH 2,9 liefen, gleich. Es bestand aus:

1 Teil Stammlösung B
2 Teilen Stammlösung D
1 Teil Stammlösung E
und 4 Teilen Aqua dest.

Es war, auch hier auf Acrylamid bezogen, 2,5%ig.

Das Sammelgel, mit dem die Probe vermischt wurde, bestand aus:

1 Teil Stammlösung B
2 Teilen Stammlösung D
und 1 Teil Stammlösung E.

Der Elektrodenpuffer war wiederum für alle pH 2,9-Elektrophoresen gleich und wurde aus folgendem gemischt:

28,10 g Glycin
3,06 ml Eisessig
mit Aqua dest auf 1000 ml.

Vor Gebrauch mußte der Elektrodenpuffer mit Aqua dest auf 1:10 verdünnt werden.

Die Stammlösungen für die Standard-Gele nach ORNSTEIN - DAVIS (50, 11) für die pH 8,9-Elektrophoresen bestanden aus:

Stammlösung A: 48,00 ml 1 N HCL
36,30 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
0,23 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
mit Aqua dest auf 100 ml

Stammlösung B: 5,98 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
auf pH 6,7 bringen mit etwa
48,0 ml 1 N HCL
0,46 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
mit Aqua dest auf 100 ml

Stammlösung D: 10,0 g Acrylamid
2,5 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid
mit Aqua dest auf 100 ml

Stammlösung E: 4 mg Riboflavin
mit Aqua dest auf 100 ml

Katalysatorlösung: 0,14 g Ammoniumperoxodisulfat
in 100 ml Aqua dest.

Das 2,5%ige Sammelgel bestand für alle pH 8,9-Elektrophoresen aus:

1 Teil Stammlösung B
2 Teilen Stammlösung D
1 Teil Stammlösung E
und 4 Teilen Aqua dest.
Es hatte einen pH-Wert von 6,7.

Das Sammelgel, mit dem die Proben vermischt wurden, entstand nach dem gleichen Rezept, jedoch ohne Zugabe von Aqua dest.

Der Elektrodenpuffer wurde aus

28,8 g Glycin
6,0 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
mit Aqua dest auf 1000 ml
hergestellt. Vor dem Gebrauch mußte er auf 1:10 verdünnt werden.
Sein pH-Wert betrug 8,3.

Die 7%igen Trenngele wurden hergestellt aus:

1 Teil Stammlösung A
2 Teilen von: 28,0 g Acrylamid
0,735 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid
mit Aqua dest auf 100 ml
1 Teil Aqua dest
und 1 Teil Katalysatorlösung.

Die 15%igen Gele entstanden aus:

1 Teil Stammlösung A
2 Teilen von: 60,0 g Acrylamid
0,735 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid
mit Aqua dest auf 100 ml
1 Teil Aqua dest
und 1 Teil Katalysatorlösung.

Für die 20%igen Gele wurden wiederum andere Mischungsteile verwendet:

1 Teil Stammlösung A

2,7 Teile von: 60,0 g Acrylamid

0,735 g N,N'-Methylenbisacrylsäureamid

mit Aqua dest auf 100 ml

1,3 Teile Aqua dest

und 1 Teil der Katalysatorlösung:

0,18 g Ammoniumperoxodisulfat

auf 100 ml Aqua dest.

Bei der Suche nach technisch guten Elektrophorese-Ergebnissen wurden bei den Versuchen verschiedene Schweißvolumina, Microcaps, Konzentrierungsarten, Schweißkonzentrat-Volumina und -Viskositäten, Gelarten und -Konzentrationen und Elektrophoreselaufzeiten verwendet.

3. ERGEBNISSE

Von 32 C.F.-Patienten wurden insgesamt 46 Schweißproben abgenommen, von 23 Kontroll-Patienten 35 Schweißproben.

18 Schweißproben von 14 verschiedenen C.F.-Patienten wurden elektrophoretisch bei pH 8,9 untersucht (Gruppe II). In 61% der Experimente ließ sich Protein anfärben. Bei 9 Elektrophoresen (50%) von 7 verschiedenen C.F.-Patienten hatte sich Protein in Banden aufgetrennt und angefärbt. Damit hatte sich in 82% der Experimente, in denen sich Protein nachweisen ließ, das Protein in Banden differenziert (Tafel I).

In den Kontrollversuchen (Gruppe I) wurden 14 Schweißproben von 8 Kontrollpersonen elektrophoretisch untersucht. In 79% der Versuche hatte sich Protein angefärbt, davon in 73% in auswertbaren Banden (Tafel I).

Bei pH 2,3 wurden 28 Schweißproben von 18 C.F.-Patienten elektrophoretisch untersucht (Gruppe IV). 14mal, das sind 50%, hatte sich Protein angefärbt. Bei 6 der 14 Elektrophoresen (43%) hatte sich ein auswertbares Proteinmuster gezeigt (Tafel I).

21 Schweißproben von 15 Kontrollpersonen wurden in den Kontrollversuchen elektrophoretisch untersucht. In 14% der Versuche färbte sich Protein an, davon zweimal in auswertbaren Banden (Tafel I).

Bei einer Gesamtzahl von 81 Experimenten konnte Protein in 39 Schweißproben (48%) nachgewiesen werden. Bei 25 der Experimente, bei denen Protein zu sehen war, war ein Proteinmuster zu erkennen (64%). Ein typisches elektrophoretisches Proteinmuster im Schweiß zeigt Abbildung 1. Als Folge der sehr geringen Proteinkonzentration in Schweiß und wegen technischer Schwierigkeiten mit der sehr empfindlichen Mikrotechnik hatte sich in vielen Fällen das Proteinmuster am Startpunkt der Elektrophorese nicht differenziert. Entweder war nur eine Bande oder keine Bande sichtbar (Tafel I).

Die Gruppen waren zu klein - begrenzt durch das Krankengut und

den Rahmen dieser Arbeit - die Parameter zu zahlreich und teilweise unkontrollierbar wechselnd, um eine in allen Punkten exakte Auswertung der Auswirkung der Änderung eines Parameters durchzuführen. Jedoch läßt sich bei Betrachtung aller 81 Versuche in den vier Gruppen folgendes feststellen:

1. Bei 33% aller Versuche mit 1er microcaps hat sich das Protein differenziert und angefärbt; bei den 5er microcaps zu 25%.
2. Bei den Gelkonzentrationen ergab sich, daß in 36% aller 20%igen Gele sich Proteinmuster gezeigt haben, beim 15%igen Gel zu 33%, den 20%igen Gelen, denen 20% Saccharose zugesetzt war, zu 20% und bei den 7%igen Gelen sich zwar Protein angefärbt, aber nicht differenziert hat; während bei den 20%igen Gelen, denen 40% Saccharose zugesetzt war, sich das Protein nicht anfärbte.
3. Auch die Konzentrierungsart machte sich in der Häufigkeit der Proteinmuster bemerkbar. In 39% der Versuche, in denen Sephadex G-10 zum Konzentrieren benutzt wurde, stellten sich Proteinmuster dar, bei Sephadex G-25 zu 19% und bei Lufttrocknung, worunter auch der Termoblock oder der Exsiccator fällt, zu 25%. Bei mit "Sartorius Membranfilter" konzentrierten Proben stellte sich kein Protein dar.
4. Bei einer Laufzeit der Elektrophoresen von 2 Minuten bei 10 V und anschließend von 30 Minuten bei 100 V stellten sich in 47% der Versuche Proteinmuster dar. Bei sechs anderen Variationen der Laufzeit lagen die Prozentsätze jeweils unter 20%.
5. Die Schweißproben wurden zwischen 15 und 3160fach konzentriert. Proteinmuster ergaben sich im Konzentrationsbereich zwischen 50 und 830fach. Da die Streuung der Konzentrationswerte sehr groß war, läßt sich keine Häufung von Proteinmustern innerhalb des Konzentrationsbereiches für eine bestimmte Konzentration der Schweißprobe feststellen. Die mittlere Konzentration der Proben, die ein auswertbares Proteinmuster ergaben, lag bei 390fach.
6. Auch eine Aussage darüber, welche Beschaffenheit der konzentrierten Proben - kristallin, hochviskös oder flüssig - zu

den besten Proteinmustern führte, läßt sich nicht exakt machen, da die Konzentrate meist aus einer Mischung der verschiedenen Zustände bestanden, deren Anteile nicht genau zu bestimmen waren. Jedoch ist die Aussage zu machen, daß am günstigsten für ein Proteinmuster die Konzentrate waren, die einen hohen Anteil an hochviskösem Material beinhalten, am ungünstigsten die noch weitgehend flüssigen Konzentrate.

7. Betrachtet man die Versuche, die jeweils die optimalen Parameter beinhalten, so ergibt sich, daß in 51% dieser Versuche sich Protein darstellte und davon in 89% als auswertbare Proteinmuster.

Da die Elektrophorese-Zeiten bei den Experimenten differierten, wurden die verschiedenen Längen der Proteinmuster durch Übertragung in ein schematisches Diagramm angepaßt. Abbildung 2 zeigt die Ausdehnung und Verteilung der Proteinbanden prozentual zur Länge der Proteinmuster. Die Intensität der Banden, die proportional zur Proteinkonzentration war, ist durch Abstufungen dargestellt. Eine Überlagerung dieser Ergebnisse zeigt die Häufigkeit der Proteinbanden in jeder Gruppe auf (Abb. 3). Der Vergleich des Proteinmusters von C.F.-Schweiß mit Kontroll-Schweiß bei pH 8,9 zeigt:

1. eine relativ hohe Übereinstimmung unter Berücksichtigung der Varianz in jeder Gruppe;
2. verglichen mit C.F.-Patienten gibt es am Startpunkt der Elektrophorese in der Kontrollgruppe mehr Protein;
3. in der Elektrophorese mit C.F.-Schweiß scheint eine zusätzliche Proteinbande vorhanden zu sein, verglichen mit Kontrollschweiß (Pfeil in Abb. 3).

Der Vergleich des Proteinmusters von C.F.-Schweiß mit Kontroll-Schweiß bei pH 2,3 zeigt:

1. eine relativ gute Übereinstimmung der Proteinmuster, besonders unter Berücksichtigung der kleinen Anzahl von Kontroll-experimenten. (Diese Anzahl ist so niedrig, weil sich nur in wenigen Kontrollproben die Banden auftrennten.);
2. Kontroll-Schweiß scheint weniger Protein als C.F.-Schweiß zu enthalten;

3. in der Elektrophorese mit C.F.-Schweiß scheint, verglichen mit Kontroll-Schweiß, eine zusätzliche Proteinbande vorhanden zu sein (Pfeil in Abb. 3).

In beiden Gruppen scheint die Proteinkonzentration bei pH 2,3 geringer als bei pH 8,9 zu sein.

4. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, nach einem möglichen Unterschied des Proteingehalts und Proteinmusters zwischen C.F.- und Kontroll-Schweiß zu suchen. Gemäß der Hypothese über die Existenz eines abnormen Polyelektrolyten im Speichel (40, 34), Schweiß (57) und Serum (30) von Patienten mit Cystischer Pancreasfibrose (C.F.-Patienten) konnte man einen Anstieg des Proteingehalts oder das Erscheinen einer besonderen Proteinbande im Schweiß von C.F.-Patienten erwarten.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß sowohl im Schweiß von C.F.-Patienten als auch bei Kontrollen Protein vorhanden ist. Frühere Untersucher, die die "wash-down-Technik" zur Schweißsammlung benutzten, zeigten ebenfalls, daß Protein im Schweiß vorhanden ist (33, 51). Allerdings sind diese Ergebnisse nicht zuverlässig, da das Protein von Abschlüpfungen der Epithelzellen der Haut herrühren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der Schweiß anaerob unter Paraffinöl direkt von der Öffnung der Ausführungsgänge der Schweißdrüsen gesammelt, um dadurch die Möglichkeit der Zellabschlüpfung auf ein Mindestmaß zu verringern.

Die oben erwähnten technischen Probleme mit der sehr empfindlichen Mikromethode und der sehr geringen Proteinmengen im Schweiß erschwerten die Interpretation der gewonnenen Daten.

Z.B. entstand bei einem Versuch mit gepooltem Schweiß eines C.F.-Patienten einmal (II 7) das für diese Gruppe typische Proteinmuster, jedoch stellte sich ein andermal (II 6) das Protein nicht dar. Bei weiteren Versuchen mit ebenfalls gepooltem Schweiß wurden übereinstimmende Proteinmuster gefunden: I 3 und I 4, I 13 und I 14, IV 29 und IV 30.

Bemerkenswert waren die mit dem Schweiß eines als "gesund" eingestuften Kindes gemachten Elektrophoresen. Die auffällige Übereinstimmung des Proteinmusters dieses "Kontrollschweißes" mit den Proteinmustern von C.F.-Schweiß führte zu einem Schweißtest des Kindes. Es ergaben sich erhöhte Elektrolytwerte. In der daraufhin erhobenen Anamnese fanden sich unklare, häufige Diarrhoen und Dyspnoen, die zu einer Änderung der Diagnose führten.

Neben der methodischen Varianz einerseits muß man auch eine interindividuelle andererseits annehmen, da mehrere Untersucher keine klare Korrelation zwischen Schwere der C.F.-Krankheit, Geschlecht oder Alter der Patienten und der absoluten Anwesenheit oder Abwesenheit des C.F.-Faktors fanden (57, 61). Einen weiteren Hinweis auf eine interindividuelle Varianz und eine Erklärung dafür, daß sich die vermutete zusätzliche Proteinbande nicht in allen C.F.-Schweißelektrophoresen darstellte, geben die Versuche von WILSON (59), der ein hitzelabiles Gamma-Globulin zwar in den meisten, aber nicht in allen C.F.-Serum, aber auch in einem von 12 Normal-Serum fand. In der gleichen Untersuchung wurde ein hitzelabiles Beta-Globulin überwiegend im Serum der Gesunden, aber auch in einem von 16 C.F.-Serum gefunden. SPOCK (21) berichtete, daß man den Cilienhemmfaktor auch in 10% symptomloser Erwachsener fand. WILSON u.a. fanden, daß das benötigte Serumvolumen, um die C.F.-Faktor-Proteinbande darzustellen, stark variierte (60).

Der C.F.-Faktor muß ein spezifisch der Mukoviszidose zuzuordnendes Molekül sein, da es sich bei Patienten mit ähnlichen oder gleichen Symptomen wie Asthma, Pancreatitis, Bronchitis u.ä. im Serum nicht nachweisen ließ (61). Das bestätigten auch die Untersuchungen von SPOCK (56) und BOWMAN (8).

Bei den verschiedenen oben aufgezeigten Theorien und Ergebnissen bei der Suche nach dem C.F.-Faktor drängt sich die Vermutung auf, daß nicht alle Untersucher immer den gleichen "C.F.-Faktor" zu beschreiben scheinen (siehe auch 21). BOWMAN (9) z.B. fand den Faktor in der IgG-Fraktion, SPOCK (21) in der IgM- und einen weiteren kleinen Teil zwischen der Albumin- und Globulin-Fraktion. Allerdings berichtete HEICK (30), daß die Verbindung des Faktors mit bestimmten Serum-Proteinfraktionen von der Salzkonzentration der Probe abhängig war.

Ein Cilienhemmfaktor wurde von mehreren Untersuchern (s.o.) im Speichel und auch in der Parotis gefunden. Allerdings war nicht auszuschließen, daß die Cilienhemmung, wie oben beschrieben, nur

auf der Hemmung durch Amylase beruhte. Ein Na-Rückresorptions-Hemmungsfaktor dagegen wurde von TAYLER (57) zwar in der gl. sublingualis und gl. submandibularis aber nicht in der gl. parotis gefunden. Er postulierte, daß der Faktor nur in Sekreten solcher Drüsen zu finden ist, die auch muköse Zelltypen enthalten. Dies scheint im Widerspruch zu dem Befund zu stehen, daß im Schweiß der Na-Rückresorptions-Hemmungsfaktor gefunden wurde. HIRSCHHORN (22) vermutete, daß der C.F.-Faktor mit Bestandteilen der IgG-Fraktion transportiert wird, so muköse Drüsen und Schweißdrüsen erreicht und hier die klinischen Symptome auslöst. Allerdings wird durch diese Hypothese der oben aufgezeigte Widerspruch nicht erklärt. MANGOS (21) und KAISER (34) vermuteten, daß die Schweißdrüsen den Faktor selbst produzieren. Unterstützt wird ihre Vermutung durch histologische Untersuchungen (20), die zeigten, daß der Sekretionsteil der menschlichen Schweißdrüse große Zellen enthält, die einen mukösen Stoff produzieren, der einen großen Teil der Epithelschicht der Schweißdrüsen bedeckt. Diese Untersuchungen fundieren so die oben angeführte Hypothese von TAYLER.

Da der C.F.-Faktor durch Heparin neutralisiert werden kann, wurde von vielen Untersuchern (53, 41, 21, 5, 10, 13, 12, 35, 59, 6) übereinstimmend eine basische Struktur des Moleküls gefordert. In den vorliegenden Experimenten wurde ein qualitativer Unterschied zwischen Schweiß von C.F.-Patienten und Kontrollen bei pH 8,9 und noch deutlicher bei pH 2,3 beobachtet. Die Anzahl der Experimente war jedoch noch zu klein, um eine endgültige Aussage zu machen. Da die Elektrophorese bei pH 2,3 die basischen Proteine trennt, war die Tendenz unserer Ergebnisse in Übereinstimmung mit der Forderung nach einer basischen Struktur des C.F.-Faktors. Eine weitere Identifikation der Beschaffenheit des Proteins im Schweiß ließ unsere Untersuchung nicht zu.

Aus den Versuchen von WILSON (59) ließe sich eine genetische Veränderung bei C.F.-Kranken gegenüber Gesunden herleiten, so daß statt eines Beta-Globulins, das bei Gesunden überwiegend gefunden wurde, bei den C.F.-Patienten ein Gamma-Globulin gebildet wird. Bei den Heterozygoten fanden sich sowohl das Beta- als auch das Gamma-Globulin.

Durch folgende Hypothese kann bei Annahme eines basischen Polyelektrolyten in exokrinen Sekreten bei C.F.-Patienten sowohl der Anstieg der Viskosität der Sekrete als auch die Hemmung der NaCl-Rückresorption in den Drüsenausführungsgängen erklärt werden (Abb. 4):

Die polykationische Struktur des Moleküls induziert eine Aggregation von verschiedenen negativ geladenen Molekülen (z.B. Protein) und verursacht so den Anstieg der Viskosität (oberer Teil von Abb. 4). Auf der anderen Seite bindet sich das Polykation an negative Festladungen (z.B. Phospholipide) der Zellmembranen des Drüsengangepithels und bewirkt so eine Verminderung des passiven Na-Einstroms in die Zelle, was damit zu einer Abnahme des aktiven transepithelialen NaCl-Transports und folglich zu einer Erhöhung der NaCl-Konzentration im Endschweiß führt (unterer Teil von Abb. 4).

5. ZUSAMMENFASSUNG

46 Schweißproben von 32 Kindern mit Cystischer Pancreasfibrose (C.F.) und 35 Schweißproben von 23 Kontrollkindern wurden anaerob gewonnen und ultramikroelektrophoretisch bei pH 2,3 und pH 8,9 untersucht.

1. Bei 39 von 81 Schweißproben ließ sich Protein nachweisen, davon in 64% als Proteinmuster;
2. die Proteinmuster von C.F.-Schweiß und Kontrollen hatten eine relativ hohe Übereinstimmung;
3. im Proteinmuster von C.F.-Schweiß scheint gegenüber Kontrollschweiß eine zusätzliche Bande vorhanden zu sein;
4. bei pH 2,3 ließ sich - bezogen auf die Anzahl der Versuche - seltener Protein darstellen als bei pH 8,9.

Es wurde vermutet, daß der C.F.-Faktor ein basischer Polyelektrolyt ist, der folgenden Pathomechanismus auslöst:

- a) Aggregation von Proteinen und dadurch Erhöhung der Viskosität des Sekretes;
- b) Bindung an Zellmembranen des Drüsengangepithels und Hemmung des aktiven Na-Transports durch Behinderung des luminalen passiven Na-Einstroms in die Zelle.

6. LEGENDE ZU DEN ABBILDUNGEN

Tafel I Nachweis von Protein und Proteinmuster bei 81 Mikroelektrophoresen von Schweiß

Abb. 1 Elektrophorese von Proteinen im Schweiß eines Patienten mit C.F.

Abb. 2 Schema der Ausdehnung der Proteinbanden prozentual zur Länge der Proteinmuster; die Intensität der Banden ist durch Gradation angezeigt

Abb. 3 Überlagerung der Ergebnisse von Abb. 2; die Pfeile zeigen auf möglicherweise abnorme Banden

Abb. 4 Schematische Darstellung einer hypothetischen molekularen Grundlage für die Pathogenese der cystischen Pancreasfibrose

TAFEL I

		A	B	C	D
		Anzahl	Prot.- Nachweis	Proteinmuster	C:B
pH 8,9	C.F.	18	11 (61%)	9 (50%)	82%
	K.	14	11 (79%)	8 (57%)	73%
pH 2,3	C.F.	28	14 (50%)	6 (21%)	43%
	K.	21	3 (14%)	2 (10%)	67%
Summe	C.F.	46	25 (54%)	15 (33%)	60%
Summe	K.	35	14 (40%)	10 (29%)	71%

K. = Kontrollen

ABBILDUNG 1



ABBILDUNG 2

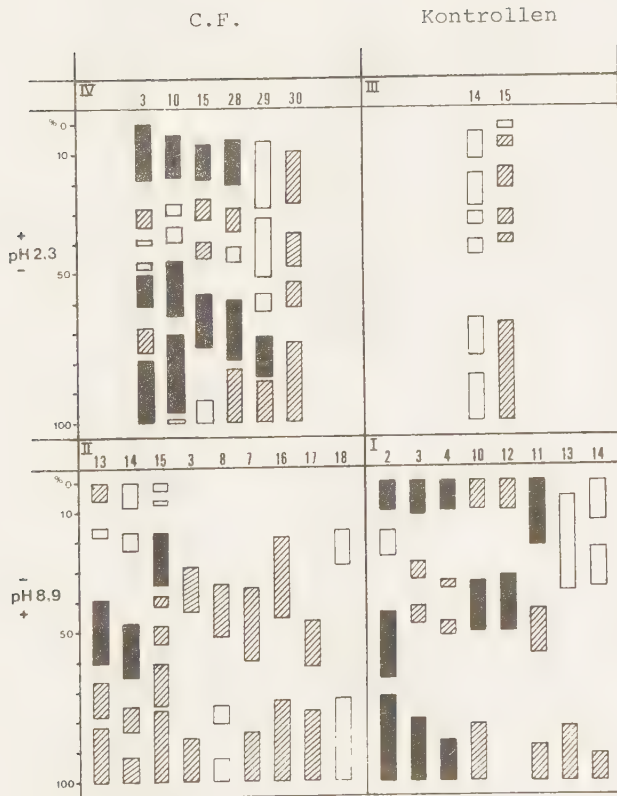


ABBILDUNG 3

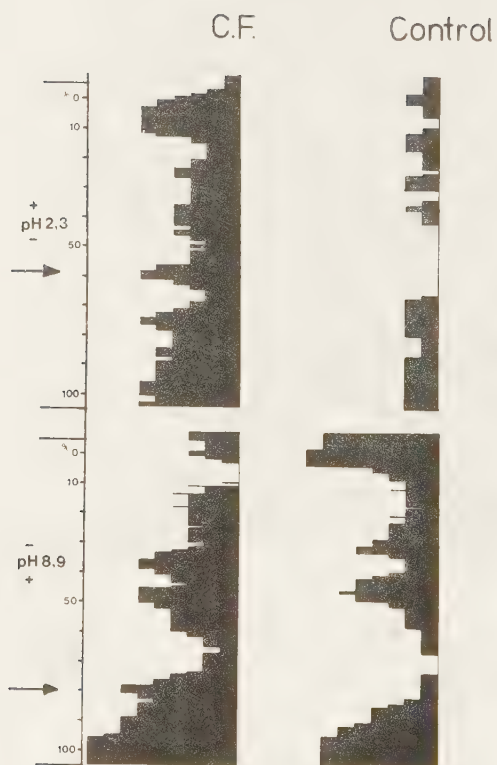
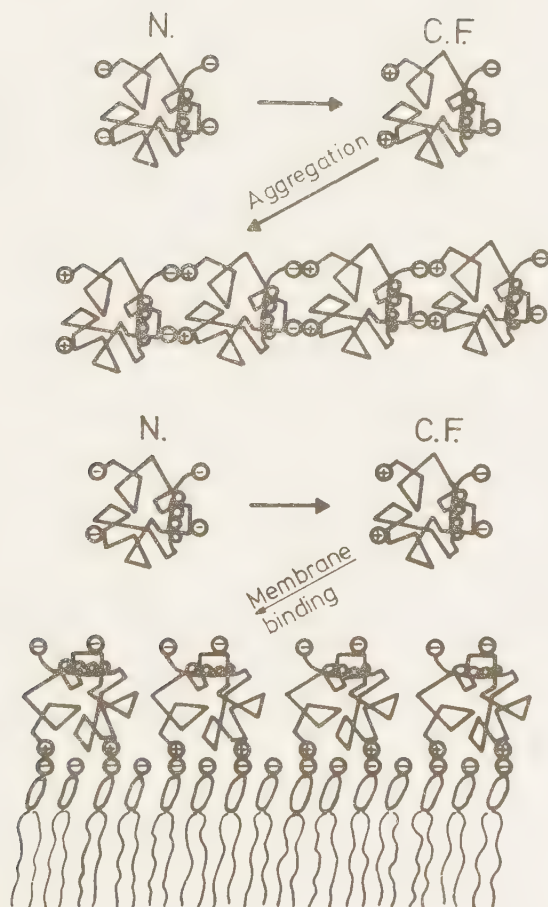


ABBILDUNG 4



1. QUELLEN

- 1 AGNESE DI SANT', P.A., DARLING, R.C., PERERA, G.A., SHEA, E.:
Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas: clinical significance, and relationship to the disease. *Pediatrics* 12: 549-563 (1953)
- 2 AGNESE DI SANT', P.A., BLANC, W.A.:
A distinctive type of biliary cirrhosis of the liver associated with fibrocystic disease of the pancreas, recognition through signs of portal hypertension. *Pediatrics* 18: 387 (1956)
- 3 BARNETT, D.R.:
C.F.: Molekular weight estimation of the ciliary inhibitor. *Tex. Rep. Biol. Med.* 31: 703-708 (1973)
- 4 BARNETT, D.R., SCHANFIELD, M.S., MCCOMBS, M.L., BOWMAN, B.H.:
Isoelectric focusing and IgG allotyping of serum fraction containing the C.F.-ciliary inhibitor. *Tex. Rep. Biol. Med.* 31: 709-714 (1973)
- 5 BARNETT, D.R., BARRANCO, S.C., LANKFORD, B.J., BOWMAN, B.H.:
C.F.: Quantitation of the ciliary inhibitor fractionated from media of cultured fibroblast derived from C.F.-patients and heterozygotes. *Am. J. Hum. Gen.* 25: 13 A (1973)
- 6 BENDER, S.W., STEPHAN, U.:
Mucoviscidose - Cystische Fibrose (1970)
- 7 BESLEY, G.T., PATRICK, A.D., NORMAN, A.P.:
Inhibition of the motility of gill cilia of *Dreissensia* by plasma of cystic fibrosis patients and their parents. *J. Med. Genet.* 6: 228 (1969)

- 8 BOWMAN, B.H., LOCKHART, L.H., MCCOOMBS, M.L.:
Oyster ciliary inhibition by cystic fibrosis factor.
Science 164: 235 (1969)
- 9 BOWMAN, B.H., SCHMOYER, J., BARNETT, D.R., KUROSKY, A.,
HUTCHISON, T.:
C.F.: Biochemical characterization of ciliary inhibitor.
Am. J. Hum. Gen. 25: 16 A (1973)
- 10 BOWMAN, B.H., BARNETT, D.R., BARRANCO, S.C., KUROSKY, A.,
MEYNE, J., LOCKHART, L.H.:
Cystic fibrosis: the ciliary inhibitor.
Genetics 74: 28-29 (1973)
- 11 DAVIS, B.J.:
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 404 (1964)
- 12 DOGETT, R.G., HARRISON, G.M.:
C.F.: Reversal of ciliary inhibitor in serum and
saliva by heparin. Tex. Rep. Biol. Med. 31: 685-689
(1973)
- 13 DOGETT, R.G., HARRISON, G.M., PATRICK, T.A.:
Cystic Fibrosis: In vivo reversal of the ciliostatic
character of serum and parotid secretions by heparin.
Nature (Lond.) New Biol. 243: 250-251 (1973)
- 14 EDSTRÖM, E.J.:
In: Methods in cell physiology (ed. Prescott, D.M.),
1: 417 (1964)
- 15 EMRICH, H.M., ULLRICH, K.J.:
Ausscheidung verschiedener Stoffe im Schweiß in Abhän-
gigkeit von der Schweißflußrate. Pflügers Arch. ges.
Physiol. 290: 298-310 (1966)

- 16 EMRICH, H.M., STOLL, E., FRIOLET, B., COLOMBO, J.P.,
RICHTERICH, R., ROSSI, E.:
Sweat composition in relation to rate of sweating in
patients with cystic fibrosis of the pancreas.
Ped. Res. 2: 464-478 (1968)
- 17 EVANS, B.W., KELSCH, R.C., HOWATT, W.F.:
Beta-glucuronidase activity in the sweat of children
with cystic fibrosis.
Am. J. Dis. Child. 127 (1974)
- 18 FANCONI, G., UEHLINGER, E., KNAUER, C.:
Das Coeliaciesyndrom bei angeborener zystischer
Pancreasfibromatose und Bronchiektasien.
Wien. med. Wchnschr. 86: 753 (1936)
- 19 FARBER, S.:
Some organic digestive disturbances in early life.
J. Michigan M. Soc. 44: 587 (1945)
- 20 FORMISANO, V., LOBITZ, W.C.:
The "schiff-positive, non-glycogen material" in the
human eccrine sweat glands.
Arch. Derm., Chicago 75: 202 (1957)
- 21 GAP-Conference Reports, Feb. 1971
- 22 GAP-Conference Reports, Okt. 1973
- 23 GIBBS, G., GRIFFIN, G.:
Quantitative determination of beta-glucuronidase in
sweat gland and other skin components in cystic
fibrosis. J. Invest. Dermatol. 51: 200-203 (1968)
- 24 GIBBS, G., GRIFFIN, G.:
Beta-glucuronidase activity in skin components of
children with cystic fibrosis. Science 167: 993-994
(1970)

- 25 GIBSON, L.E., COOKE, R.E.:
A test for concentration of electrolytes in sweat in
cystic fibrosis of the pancreas utilising pilocarpine
by iontophoresis. *Pediatrics* 23: 545-549 (1959)
- 26 GORDON, A.H.:
In: WORK, T.S. and WORK, E. (Eds.), *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, Vol. 1,
part 1, Amsterdam and London (1969)
- 27 GROSSBACH, U.:
Biochem. Biophys. Acta 107: 180 (1965)
- 28 GROSSBACH, U.:
Microelectrophoresis of proteins on the cellular level.
In: *Techniques of biochemical and biophysical morphology* Vol. 3. D. GLICK and R.M. ROSENBAUM, Eds., N. Y.
(Wiley) (1975)
- 29 GROTH St. de, S.F., WEBSTER, R.G., DATYNER, A.:
Biochem. Biophys. Acta 71: 377 (1963)
- 30 HEICK, H.M.C., SPOCK, A., SIDBURY, J.B.:
Effect of salt concentration on the serum factor in
C.F. Clin. Res. 21: 1037 (1973)
- 31 HERZBERG, V., CALVERT, L., BOWMAN, B.H.:
Evidence that the ciliary inhibitor is not an antibody.
J. Clin. Invest. 52: 2732-2736 (1973)
- 32 HOUSTĚK, J., JIRKA, M.:
Schweißproteine in C.F. *Mod. Prob. Pediat.* 10: 247-254
(1967)
- 33 JIRKA, M., MASOPUST, J.:
Immunelectrophoresis of sweat proteins.
Nature 199: 283 (1963)

- 34 KAISER, D., DRACK, E., ROSSI, E.:
Inhibition of net sodium transport in single sweat glands by sweat of patients with cystic fibrosis of the pancreas. *Ped. Res.* 5: 167-172 (1971)
- 35 KHAN, M.A., LITT, M., KWART, H., ROSENBLUND, M.L.:
Measurement of colloid zeta potential as a test for C.F. sekretion factor. *Tex. Rep. Biol. Med.* 31: 665-683 (1974)
- 36 KOHLRAUSCH, F.:
Ann. Physik und Chemie 62: 209 (1897)
- 37 LOBECK, C.C.:
Cystic fibrosis. In: *The metabolic basis of inherited disease* (eds. J.B. STANBURY, J.B. WYNGAARDEN, D.S. FREDRICKSON). New York-Toronto-Sydney-London: McGRAW-Hill 1972
- 38 LOUISOT, P., LEVRAT, C.:
A new pathogenic hypothesis for cystic fibrosis: Hyperactivity of glycosyl transferases at microsomic level. *Clin. Chim. Acta* 48: 373-376 (1973)
- 39 MANGOS, J.A., McSHERRY, N.R.:
Sodium transport: Inhibitory factor in sweat of patients with cystic fibrosis. *Science* 158: 135-136 (1967)
- 40 MANGOS, J.A., McSHERRY, N.R., BENKE, P.J.:
A sodium transport inhibitory factor in the saliva of patients with cystic fibrosis of the pancreas. *Pediat. Res.* 1 436-442 (1967)
- 41 MANGOS, J.A., McSHERRY, N.R.:
Studies on the mechanism of inhibition of sodium transport in cystic fibrosis of the pancreas. *Ped. Res.* 2: 378-384 (1968)

- 42 MANGOS, J.A.:
Microperfusion study of the sweat gland abnormality in
C.F. Tex. Rep. Biol. Med. 31: 651-663 (1973)
- 43 MAURER, H.R.:
Disk-Elektrophorese, Theorie und Praxis der diskonti-
nuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
Walter de Gruyter & Co, Berlin (1968)
- 44 MAURER, H.R.:
Disc electrophoresis and related techniques of poly-
acrylamide electrophoresis.
W. de Gruyter, Berlin (1971)
- 45 McCOOMBS, M.L.:
Research in cystic fibrosis: A review. Tex. Rep. Biol.
Med. 31: 615 (1973)
- 46 McEVOY, F.A., HARTLEY, C.B.:
Polyamines in cystic fibrosis. Ped. Res. 9: 721-724
(1975)
- 47 MEYER, T.S., LAMBERTS, B.L.:
Biochem. Biophys. Acta 107: 144 (1965)
- 48 MOSS, B., INGRAM, V.M.:
Proc. Nat. Acad. Sci. 54: 967 (1965)
- 49 NIKOLAJEK, W.P., EMRICH, H.M.:
Alpha-amylase activity in sweat and serum of patients
with cystic fibrosis of the pancreas.
Europ. J. Pediat. 122: 289-291 (1976)
- 50 ORNSTEIN, L.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 321 (1964)
- 51 PAGE, C. O'N., REMINGTON, J.S.:
Immunologic studies in normal human sweat. J. of Lab.
and Clin. Med. Vol. 69 N^o 4: 634 (1967)

- 52 RAO, G.J.S., NADLER, H.L.:
Arginine esterase in cystic fibrosis of the pancreas.
Ped. Res. 8: 684-686 (1974)
- 53 SCHWARZ, V., SUTCLIFFE, C.H.:
The effect of some ions and drugs on sweat secretion.
NCFRF, Vol. VII, N^o 1: 6890 (1968)
- 54 SEPHADEX: Eine kurze Einführung in das Verfahren der Gel-Filtration. Pharmacia Uppsala, Schweden
- 55 SEPHADEX: Theorie und experimentelle Technik der Gel-Filtration. Pharmacia Uppsala, Schweden
- 56 SPOCK, A., HEICK, H.M.C., CRESS, H., LOGAN, W.S.:
Abnormal serum factor in patients with cystic fibrosis of the pancreas.
Ped. Res. 1: 173 (1967)
- 57 TAYLER, A., MAYO, J.W., BOAT, T.F., MATTHEWS, L.W.:
Standardized assay for the sodium reabsorption inhibitory effect and studies of its salivary gland distribution in patients with cystic fibrosis.
Ped. Res. 8: 861-865 (1974)
- 58 WHITE, M.L., DORION, G.H.:
J. Polymer Sci. 55: 731 (1961)
- 59 WILSON, G.B., JAHN, T.L., FONSECA, J.R.:
Demonstration of serum protein differences in cystic fibrosis by isoelectric focusing in thinlayer polyacrylamide. Clin. Chim. Acta 49: 79 (1973)
- 60 WILSON, G.B.:
Studies on the cystic fibrosis serum factor and on the nature of the ciliary beat of Colpidium striatum.
Ph. D. Thesis. University of California, L.A., Dis.
Abst. Intern. 35: 479 (1974)

61 WILSON, G.B., FUDENBERG, H.H., JAHN, T.L.:

Studies on cystic fibrosis using isoelektric focusing.
An assay for detection of cystic fibrosis homozygotes
and heterozygotes carriers from serum.
Ped. Res. 9: 635-640 (1975)

Herrn Prof. Dr. H. M. Emrich danke ich für die Überlassung des Themas und Unterstützung bei der Veröffentlichung der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. U. Großbach vom Max-Planck-Institut für Biochemie für die freundliche Hilfe und Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie seiner Mitarbeiterin Frä. E. Kasch.

LEBENS LAUF

Name: Claus-P. Schröder
Geb.-Datum: 9. November 1946
Geb.-Ort: Kiel
Familienstand: verheiratet

Abitur: 1968 auf dem math.-nat. Zweig in Hamburg
Grundwehrdienst: von April 1968 bis September 1969 beim
BGS

Studium: WS 1969 Naturwissenschaft an der Uni-
versität in Hamburg, SS 1970 bis SS 1976
Medizin in München an der Ludwig-
Maximilians-Universität

Staatsexamen: SS 1976

Ausbildung während der
Medizinalassistentenzeit: von Dezember 1976 bis Mai 1977 Innere
Abteilung des Kreiskrankenhauses Donau-
wörth, von Juni 1977 bis September 1977
Chirurgische Abteilung des Kreiskranken-
hauses Donauwörth, im Oktober und No-
vember 1977 als MA auf der Geburtshilf-
lich-Gynäkologischen Abteilung des
Kreiskrankenhauses Wertingen

Approbation: Dezember 1977

Ausbildung als
Assistenzarzt: bis Februar 1979 Verbleib auf der Ge-
burtshilflich-Gynäkologischen Abteilung
des Kreiskrankenhauses Wertingen,
seit März 1979 Regionale Anästhesie-
Intensiv-Abteilung des Landkreises
Dillingen

